

Foto: Fabio de Oliveira Freitas



Protocolo de Extração de DNA de Amostras de Casca dos Frutos de Amendoim (*Arachis hypogaea*, L.) e Outras Espécies de *Arachis*

Fabio de Oliveira Freitas¹

Introdução

Desde o início do uso da técnica de PCR, em meados da década de 1980, muito se evoluiu nas questões de extração e uso de material genético a partir de diferentes tipos de amostras e de distintas espécies (SAIKI et al., 1985; MULLIS; FALOONA, 1987).

As técnicas estão cada vez mais precisas, mais sensíveis, relativamente mais baratas, mais simples, muito mais rápidas, necessitando de porções cada vez menores de amostra e, de modo inverso, retornando um volume de informações cada vez maior.

Essa evolução das técnicas, dos *kits* e equipamentos e o acúmulo de experiências vêm permitindo que uma série de materiais e partes

específicas de tecidos, anteriormente não utilizados para a extração de material genético, agora possam ser utilizadas. A escolha desses novos materiais ou tecidos pode, ainda, ser motivada por diferentes fatores. Um desses fatores se relaciona ao estudo da expressão diferenciada dos genes em diferentes tecidos e órgãos de uma espécie (SONG et al., 2005).

Outro motivo são os estudos com amostras arqueológicas, nos quais é muito comum contar apenas com fragmentos de um dado organismo. E esses fragmentos, além de normalmente serem pequenos, podem ser tecidos ou estruturas da espécie que normalmente não são utilizados nos diversos tipos de análises genéticas (FREITAS et al., 2003; PALMER et al., 2012).

De modo geral, quando se quer caracterizar

¹Engenheiro-agrônomo, Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

geneticamente diferentes espécies ou populações de uma mesma espécie do gênero *Arachis*, usualmente utilizam-se folhas novas para extrair material genético (GIMENES et al., 2002; BECHARA et al., 2010; MORETZSOHN et al., 2013).

A casca do fruto do amendoim não é comumente utilizada nas extrações de material genético por alguns motivos, como, por exemplo: a existência de protocolos já bem padronizados com a utilização de folhas ou sementes; a ideia de uma menor concentração de material genético na casca do que nas folhas; maior dificuldade na maceração da casca devido à maior rigidez e presença de fibras.

O uso da casca do fruto também faz com que haja maior chance de encontrar material genético contaminante na amostra, uma vez que o fruto do amendoim se desenvolve dentro do solo. Somado a isso, pela sua característica de grande rugosidade na casca, que apresenta muitas saliências e está mais sujeita a hospedar restos de solo, com grande chance de ocorrerem diferentes espécies de microrganismos típicos da microfauna do solo. Por esses fatores, novamente, os trabalhos acabam não priorizando a extração de material genético a partir da casca do fruto do amendoim.

Entretanto, em alguns casos, o uso da casca para obter material genético é importante, ou pode ser a única opção. É o caso, por exemplo, quando se quer estudar a microfauna do solo que está associada ao amendoim (metagenômica), ou nos casos em que não existe à disposição uma grande quantidade de sementes e, desse modo, não se quer “desperdiçar” sementes nesse tipo de análise, a qual é destrutiva. Ou, ainda, quando não há sementes à disposição ou estas já perderam o poder germinativo, como, por exemplo, em material de exsicata guardado em herbários, ou mesmo de material arqueológico. Nestes casos, de modo geral, existem mais amostras da casca do que das sementes e ainda menos de folhas, além do fato de que fragmentos da casca do fruto do amendoim são mais facilmente identificados por não especialistas.

Neste contexto, buscou-se aprimorar os protocolos já existentes de extração de material genético de espécies do gênero *Arachis*, a partir da casca do fruto dessas espécies, uma vez que havia uma série de amostras arqueológicas, com o objetivo

de resgatar o DNA desses materiais para estudos evolutivos e de caracterização.

Dessa maneira, a seguir apresenta-se o protocolo desenvolvido para esse fim, desenvolvido nas dependências da Universidade de Warwick – *School of Life Science*, em parceria com o grupo de pesquisa liderado pelo Dr. Robin Allaby.

Protocolo de extração de material genético da casca do fruto de espécies do gênero *Arachis*

Obs.: neste protocolo, utilizou-se o *kit* de extração da Qiagen – *DNeasyPlant*.

- Macerar a amostra com pilão em cadinho até que esta fique a mais pulverizada possível (evitar utilizar nitrogênio líquido, pois ele fragmenta o DNA).
- Colocar a amostra macerada em microtubo *Eppendorf* de 1,5 ou 2 mL.
- Adicionar 500 μ L de tampão CTAB, fechar o tubo e agitar com *vortex*.
- Incubar em banho-maria ou bloco de aquecimento a 65°C por 1-2 horas.
- * Se a amostra for antiga, usar bloco de aquecimento e deixar a 37,5°C, de 2-7 dias, sob agitação de 400 rpm (rotações por minuto).
- Retirar o tubo do calor.
- Adicionar igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) (500 μ L).
- *Vortex* durante 10 segundos.
- * Se a amostra for antiga, agitar manualmente, delicadamente, por 10 minutos.
- Centrifugar durante 2 minutos à velocidade máxima (25.000 rpm).
- Pegar um novo tubo de 1,5 mL.
- Transferir a fase líquida superior da amostra (cerca de 400 μ L) para um microtubo de 1,5 mL e descartar o restante.
- * Se a amostra for antiga, transferi-la para um tubo com capacidade maior.
- Adicionar na amostra 1,5x do volume (cerca de 600 μ L) de tampão de lavagem 1 - *wash buffer* 1 (AW1 – do *kit* de extração).
- * Se a amostra for antiga, adicionar 5x de tampão (em vez de 1,5x) – cerca de 2 mL.
- Agitar brevemente com *vortex* (1-2 segundos) para misturar.
- * Se a amostra for antiga, agitar manualmente de forma muito suave e deixar descansando por 2 horas

(coberta em papel alumínio para evitar exposição à luz).

- Transferir 600 μ L deste líquido para uma coluna de extração (*spin column*, do *kit* de extração).
- Centrifugar a 6.000 rpm durante 1 minuto.
- Descartar o líquido.
- Repetir as etapas anteriores até todo o líquido ter passado através da coluna.
- Adicionar à coluna 500 μ L de tampão de lavagem 2 (AW2, do *kit* de extração).
- Centrifugar a 6.000 rpm durante 1 minuto.
- Descartar o líquido.
- Adicionar 300 μ L de acetona na coluna de extração.
- Centrifugar a 6.000 rpm durante 1 minuto.
- Colocar a coluna dentro de um novo tubo *Eppendorf* (jogar fora o tubo antigo, incluindo o líquido, em local apropriado para descarte de acetona).
- Abrir a tampa e deixar secar por 4 minutos.
- Adicionar 100 μ L de tampão de eluição (EB) na membrana da coluna.
- Deixar por 1 minuto.
- * Se a amostra for antiga, deixar por 15 minutos.
- Centrifugar a 20.000 rpm durante 1 minuto.
- Descartar a coluna e manter o líquido (este contém o DNA!).
- *Vortex* por 1-2 segundos.
- Guardar o extrato a -20°C.

Conclusões

Como expressado anteriormente, o uso da casca dos frutos de amostras das diferentes espécies do gênero *Arachis* amplia as possibilidades de pesquisa, tanto porque permite que se utilize um leque maior de tipos de tecidos para extração de material genético, como também permite que se possa obter informações em casos específicos, por exemplo, quando não há à disposição folhas e sementes, as quais são normalmente utilizadas. Dentre as espécies do gênero, este protocolo já foi testado com sucesso em amostras de *A. hypogaea*, *A. monticola*, *A. ipaensis*, *A. duranenses*, *A. villosulicarpa* e *A. stenosperma*.

Na Figura 1, apresenta-se graficamente o resultado da extração de DNA de uma das amostras arqueológicas de amendoim já estudadas.

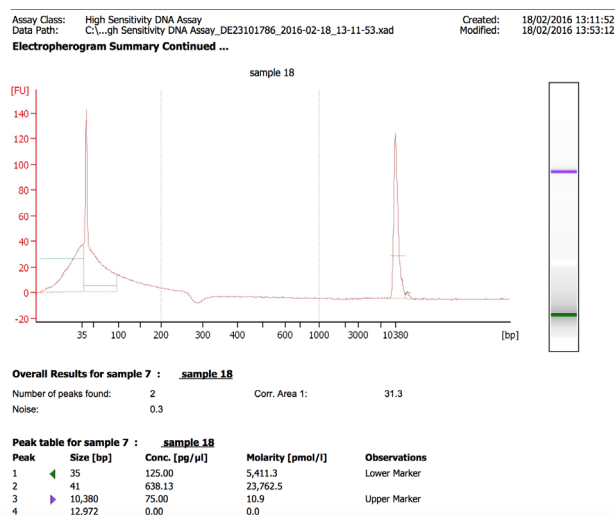


Figura 1. Quantificação de material genético extraído de amostra arqueológica por meio de *High Sensitivity DNA Assay*. A amostra arqueológica em questão tem uma idade estimada de 2.700 anos, proveniente de um sítio arqueológico da costa do Peru. O padrão de quantidade e o tamanho dos fragmentos de DNA são compatíveis com o esperado para esse tipo de amostra (DNA mais fragmentado).

Com a degradação de muitos ambientes de ocorrência histórica natural de algumas das espécies do gênero *Arachis*, atualmente já não se encontram algumas populações registradas no passado, e corre-se o risco dessa dificuldade aumentar ainda mais.

Nesses casos, pode-se recorrer às amostras de exsiccatas mantidas em herbários, das quais podem ser coletadas pequenas amostras da casca do fruto, por exemplo, para estudos genético-evolutivos.

Outra possibilidade de uso dessa metodologia, destacado pelo pesquisador José Valls* (comunicação pessoal, 2016), refere-se àquelas espécies das quais foram coletadas sementes nas populações naturais, mas, devido a particularidades de crescimento, não se conseguiu manter essas plantas vivas em casa de vegetação.

Segundo aquele pesquisador, é de praxe guardar as cascas dos frutos das sementes que foram colocadas para germinar. Assim, no Banco de Germoplasma de Espécies Silvestres de *Arachis* existem diversas amostras de casca de frutos de coletas históricas, tornando possível tanto fazer estudos sobre a genética daqueles indivíduos como também fazer estudos de metagenômica da microfauna do solo do local onde aquelas amostras foram coletadas.

Com o tempo, o material genético das amostras arqueológicas tende a se fragmentar e degradar. Desse modo, para se conseguir o resgate desse material, necessita-se de protocolos mais sensíveis, além de uma série de procedimentos para se evitar contaminação com material genético moderno (PALMER, 2012). Portanto, a metodologia descrita no presente trabalho torna possível estudar restos de amostras arqueológicas, pois além de permitir que se use a casca do fruto como material de estudo, que é mais facilmente preservada nos sítios arqueológicos, também é sensível o suficiente para resgatar o material genético dessas amostras.

Referências Bibliográficas

BECHARA, M. D.; MORETZSOHN, M. de C.; PALMIERI, D. A.; MONTEIRO, J. P.; BACCI JUNIOR, M.; MARTINS JUNIOR, J.; VALLS, J. F. M.; LOPES, C. R.; GIMENES, M. A. Phylogenetic relationships in genus *Arachis* based on ITS and 5.8S rDNA sequences. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 255, 2010.

FREITAS, F. O.; BANDEL, G.; ALLABY, R. G.; BROWN, T. A. DNA from primitive maize landraces and archaeological remains: Implications for the domestication of maize and its expression into South America. **Journal of Archaeological Science**, v. 30, n. 7, p. 901-908, 2003.

GIMENES, M. A.; LOPES, C. R.; VALLS, J. F. M. Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 349-353, 2002.

MORETZSOHN, M. de C.; GOUVEA, E. G.; INGLIS, P. W.; BERTIOLI, S. C. de M. L.; VALLS, J. F. M.; Bertioli, D. J. A study of the relationships of cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) and its most closely related wild species using intron sequences and microsatellite markers. **Annals of Botany**, v. 11, p. 113-126, 2013.

MULLIS, K; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 55, p. 335-350, 1987.

PALMER, S. A.; CLAPHAM, A. J.; ROSE, P.; FREITAS, F. O.; OWEN, B. D.; BERESFORD-JONES, D.; MOORE, J. D.; KITCHEN, J. L.; ALLABY, R. G. Archaeogenomic evidence of punctuated genome evolution in *Gossypium*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 8, 2012.

SAKI, R. K; SCHARF, S. J; FALOONA, F.; MULLIS, K. B; HORN, G.T; ERLICH, H. A; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SONG, F.; SMITH, J. F.; KIMURA, M. T.; MORROW, A. D.; MATSUYAMA, T.; NAGASE, H.; HELD, W. A. Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression.

* VALLS, J. F. M. Comunicação pessoal – Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Fevereiro de 2016.

Proceedings of National Academy of Science, v.
102, n. 9, p. 3336-3341, 2005.

Comunicado Técnico 200

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Endereço: Parque Estação Biológica (PqEB) - Avenida W5
Norte - Caixa Postal 02372 - Brasília, DF, Brasil
CEP: 70770-900
Fone: (61) 3448-4700
Fax: (61) 3340-3624
E-mail: sac@cenargen.embrapa.br
1ª edição
Publicação *online* (2016)

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê Local de Publicações

Presidente: Maria Isabela Lourenço Barbirato
Secretário-Executivo: Thales Lima Rocha
Membros: Daniela Aguiar de Souza Kols, Lígia Sardinha Fortes,
Lucas Machado de Souza, Márcio Martinello Sanches, Rosamares
Rocha Galvão
Membros suplentes: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes,
João Batista Tavares da Silva

Expediente

Normalização bibliográfica: Ana Flávia do N. Dias Côrtes
Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães
Tratamento das ilustrações: José Cesamildo Cruz Magalhães
Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães